



**Universidade Nova de Lisboa
Instituto de Higiene e Medicina Tropical**

**Do genótipo ao fenótipo na síndrome de Marfan: um estudo
de associação numa amostra de Pacientes portugueses**

Autor: Hélia Lourenço Guerreiro

DISSERTAÇÃO APRESENTADA PARA CUMPRIMENTO DOS REQUISITOS NECESSÁRIOS À OBTENÇÃO
DO GRAU DE MESTRE EM CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

OUTUBRO 2015



**Universidade Nova de Lisboa
Instituto de Higiene e Medicina Tropical**

**Do genótipo ao fenótipo na síndrome de Marfan: um estudo
de associação numa amostra de Pacientes portugueses**

Autor: Hélia Lourenço Guerreiro

Orientador: Doutora Ana Margarida T. Santos Coutinho

DISSERTAÇÃO APRESENTADA PARA CUMPRIMENTO DOS REQUISITOS NECESSÁRIOS À OBTENÇÃO
DO GRAU DE MESTRE EM CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

AGRADECIMENTOS

A três grandes senhoras, que sem elas seria impossível a conclusão do mestrado.

À Rute Marcelino, que me manteve à superfície e nunca me deixou desistir.

À Ana Coutinho, que me guiou na direção certa e que sem ela não teria conseguido.

E à minha mãe, que agora faz parte das estrelas. Que me ensinou que a vida nunca será fácil, mas existirão sempre pessoas na nossa vida que nos impedem de desistir.

RESUMO

A síndrome de Marfan (MFS) é uma doença hereditária do tecido conjuntivo, com manifestações multissistêmicas, envolvendo os sistemas esqueléticos (grande crescimento dos ossos e laxidez articular). As estimativas mais recentes apontam para uma prevalência de 1:5000. Os critérios clínicos usados no diagnóstico, designados de *Ghent*, recaem mais sobre manifestações cardiovasculares, sendo que o aneurisma da raiz da aorta e a *ectopia lentis* são as características fundamentais. Na ausência de qualquer história familiar, a presença destas duas características são suficientes para o diagnóstico inequívoco de MFS; no entanto, na ausência de uma destas características, é necessária a presença de uma mutação no gene *FBNI*.

A MFS (OMIM #154700 - *Online Mendelian Inheritance in Man*) apresenta um padrão de hereditariedade autossômica dominante, sendo causada por mutações no gene *FBNI*. O teste genético assume uma grande importância, visto que a esperança média de vida dos doentes com MFS quando não tratados é de 32 anos podendo, no entanto, atingir valores de 60 anos quando adequadamente tratados.

Este projeto visa a identificação e descrição de novas mutações no gene *FBNI* e assim: aumentar o conhecimento sobre a base genética da doença; analisar a patogenicidade de novas mutações com programas informáticos *in silico* (predições) e ainda realizar estudos de correlação fenótipo-genótipo, que irão fornecer informações sobre o espectro da variação fenotípica da doença e que serão usados como base de ajuste das diretrizes mundiais à população portuguesa.

Os doentes foram clinicamente avaliados pelo departamento de cardiologia de hospitais portugueses. Foram analisados 43 doentes com MFS, realizando o estudo genético através da pesquisa de mutações no gene *FBNI* por PCR e sequenciação direta. A patogenicidade das mutações encontradas foi estudada utilizando 7 programas diferentes de análise por simulação computacional.

Foram encontradas mutações em 12 doentes, 5 das quais não se encontram descritas na literatura. A maioria dos programas de análise por simulação computacional classificou como patogénicas as novas mutações encontradas.

Estes resultados realçam a importância do teste genético em pacientes com MFS, permitindo um diagnóstico específico e influenciando as opções terapêuticas. As análises por simulação computacional, em relação à patogenicidade das mutações, permitem uma simples e fiável avaliação das novas variantes. Estes resultados podem contribuir para estudos de correlação genótipo-fenótipo.

Palavras-chave: Síndrome de Marfan, novas mutações, análise por simulação computacional, associações genótipo-fenótipo.

ABSTRACT

Marfan syndrome (MFS) is an inherited connective tissue disease with multisystem manifestations involving the skeletal systems (large bone growth and joint hyperlaxity). The most recent estimates suggest a prevalence of 1:5000. The clinical criteria used in the diagnosis, called Ghent criteria, focus more on cardiovascular manifestations wherein the aneurysm aortic root and *ectopia lentis* are the fundamental characteristics. In absence of any family history, the presence of these two features is enough for unambiguous diagnosis of MFS; however, in the absence of one these features, the presence of a mutation in the *FBNI* gene is required.

MFS (OMIM #154700 - Online Mendelian Inheritance in Man) shows a pattern of autosomal dominant inheritance, and is caused by mutations in the *FBNI* gene.

Genetic testing assumes a major importance, given that the average life expectancy of patients with MFS when untreated is 32 years old, and when properly treated may achieve 60 years old.

This project aims at the identification and description of new mutations in the *FBNI* gene, and thus: increase knowledge about the disease genetic basis; analyze the pathogenicity of new mutations with *in silico* software (predictions) and also conduct studies of phenotype-genotype correlations, which will provide information about the spectrum of phenotypic variation of the disease and that will be used as an adjustment basis of global guidelines to the Portuguese population.

Patients were clinically diagnosed by the cardiology department of Portuguese hospitals. 43 patients with MFS were subject to genetic studies, through screening of mutations in the *FBNI* gene by PCR and direct sequencing. The pathogenicity of the mutations found was assessed using 7 different programs of analysis by computer simulation.

Mutations were found in 12 patients, 5 of which are not described in the literature. Most of the computational simulation analysis programs classified the new mutations found as pathogenic.

These results highlight the importance of genetic testing in patients with MFS, allowing specific diagnosis and influencing the treatment options. The analysis by computer simulation, in relation to the pathogenicity of mutations, allows a simple and reliable evaluation of new variants. These results can contribute to genotype-phenotype correlation studies.

Key words: Marfan syndrome, new mutations, analysis by computer simulation, associations genotype-phenotype.

ÍNDICE

AGRADECIMENTOS	i
RESUMO.....	ii
ABSTRACT	iii
ÍNDICE	iv
ÍNDICE DE FIGURAS.....	vi
ÍNDICE DE TABELAS	vii
LISTA DE ABREVIATURAS.....	viii
GLOSSÁRIO	x
1 INTRODUÇÃO.....	1
1.1 O que é a síndrome de Marfan?.....	1
1.2 Fisiopatologia.....	1
1.2.1 A identificação do gene <i>FBN1</i> , que codifica a glicoproteína fibrilina-1	1
1.3 Genética.....	3
1.4 Diagnóstico da doença.....	4
1.4.1 Critérios de diagnóstico <i>Ghent</i>	4
1.4.1.1 Caso índice.....	4
1.4.1.2 No caso de ausência de história familiar de MSF, o diagnóstico pode ser estabelecido no caso índice, de acordo com quatro cenários.....	4
1.4.1.3 Na presença de história familiar (usando estes critérios), o diagnóstico pode ser estabelecido para um familiar direto do caso índice, usando três cenários.....	5
1.4.2 Apresentação clínica	5
1.4.2.1 Manifestações músculo-esqueléticas.....	5
1.4.2.2 Manifestações cardiovasculares.....	7
1.4.2.3 Manifestações oftalmológicas.....	8
1.4.2.4 Manifestações dermatológicas.....	8
1.5 Diagnóstico diferencial.....	8

2	MATERIAL E MÉTODOS	12
2.1	Amostra.....	12
2.2	Extração de ADN.....	15
2.3	Quantificação do ADN.....	15
2.4	Pesquisa de mutações.....	16
2.5	Condições de PCR.....	16
2.6	Eletroforese.....	19
2.7	Purificação de PCR	19
2.8	Sequenciação	20
2.9	Programas de análise computacional <i>In silico</i>	21
2.9.1	<i>Sift Blink</i> [®]	22
2.9.2	<i>UMD Predictor</i> [®]	22
2.9.3	<i>The Human Splicing Finder</i> [®]	23
2.9.4	<i>SNPeffect 4.0</i> [®]	23
2.9.5	<i>SNPs&GO</i> [®]	23
2.9.6	<i>PolyPhen-2</i> [®]	24
2.9.7	<i>MutationTaster</i> [®]	24
3	RESULTADOS.....	26
3.1	Resultados genéticos.....	26
3.2	Patogenicidade das novas variantes	29
4	DISCUSSÃO.....	32
5	CONCLUSÕES	33
6	BIBLIOGRAFIA.....	35
7	ANEXOS	39
	Anexo 1.....	39
	Anexo 2.....	42

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 - Localização do gene <i>FBNI</i> no cromossoma 15.....	1
Figura 2 - Estrutura primária da Fibrilina-1.	2
Figura 3 - Doença autossômica dominante.....	3
Figura 4 - Sinal Steinberg.	6
Figura 5 - Sinal de Walker-Murdoch.....	6
Figura 6 - <i>Pectus carinatum</i>	7
Figura 7 - <i>Pectus excavatum</i>	7
Figura 8 - Ecocardiograma transesofágico em paciente com MFS; A) Insuficiência mitral; B) Prolapso mitral; C) Insuficiência aórtica; D) Dilatação aneurismática da aorta ascendente.	8
Figura 9 - Subluxação do cristalino.	8

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1 - Critérios de diagnóstico para a síndrome de Marfan	5
Tabela 2 - Diagnóstico diferencial	9
Tabela 3 - Casos e informações clínicas.	12
Tabela 4 - <i>Mix</i> de PCR standard.	18
Tabela 5 - <i>Mix</i> de PCR com 1,25 µl de DMSO	18
Tabela 6 - <i>Mix</i> de PCR com 1,25µl de DMSO e 1µl de MgCl ₂	18
Tabela 7 - <i>Mix</i> de PCR com AmpliTaq Gold.	18
Tabela 8 - Condições de termociclador	18
Tabela 9 - <i>Mix</i> para reações de sequenciação.	20
Tabela 10 - Condições do termociclador para a reação de sequenciação	20
Tabela 11 - Resultados genéticos.....	26
Tabela 12 - Predições <i>in silico</i>	30

LISTA DE ABREVIATURAS

AA - Aminoácidos
ADN - Ácido Desoxirribonucleico
bp - pares de bases
DMSO - Dimetilsulfóxido
dNTPs - Desoxirribonucleotídeos trifosfatados
EDS - Síndrome de Ehlers-Danlos
EDTA - Ácido EtilenoDiamino Tetra-Acético
FBN1 - gene *fibrilina-1*
H_FERNFONS - Hospital Professor Doutor Fernando Fonseca, EPE
HGHORT - Hospital Garcia da Orta
HGMD - *The Human Gene Mutation Database*
HGVS - *Human Genome Variation Society*
HSF - *The Human Splicing Finder*
HSFX - Hospital São Francisco Xavier
HSM - Hospital de Santa Maria
kb - kilobases
mARN - Ácido Ribonucleico mensageiro
MFS - Síndrome de Marfan
MgCl₂ - Cloreto de magnésio
NMF - *National Marfan Foundation*
OMIM - *Online Mendelian Inheritance in Man*
PART - Particular
PCR - *Polymerase Chain Reaction*
PSSM - *Position Specific Scoring Matrix*
RCLB - *Red Cell Lysing Buffer*
SDS - Dodecil sulfato de sódio
SIFT - *Sorting Intolerant from Tolerant*
T_a - Temperatura de *annealing*
TAE buffer - Tris base, Ácido acético e EDTA
TE - Tris-EDTA

TGFBRI - gene *transforming growth factor, beta receptor 1*

TGFBRI2 - gene *transforming growth factor, beta receptor 2*

Uniprot - *Universal Protein Resource*

UV – Ultravioleta

V/V – Volume/ Volume

GLOSSÁRIO

Anneling - A temperatura de *annealing* (T_a) é a temperatura à qual ocorre o emparelhamento entre *primer* e o ADN.

Caso índice - Indivíduo afetado por uma doença genética a determinar (primeiro caso identificado na família).

Caso preditivo - Indivíduo saudável pertencente a uma família em que foi identificada uma determinada doença genética (no caso índice) e que, após aconselhamento genético, tem indicação para fazer um teste preditivo.

Fenótipo - Características observáveis ou caracteres de um organismo ou população (i.e. morfologia, desenvolvimento, propriedades bioquímicas ou fisiológicas e comportamento).

Genótipo - é a constituição genética de uma célula, organismo ou indivíduo. Deve-se à presença de material hereditário herdado dos progenitores.

Grandes rearranjos - Todas as variações estruturais detetáveis a nível citogenético, assim como variações do mesmo tipo só detetáveis a nível nucleotídico (nomeadamente inserções, deleções, inversões, duplicações); são rearranjos do ADN.

Haploinsuficiência - Variação do número de cópias de um gene que resulta numa diminuição da dosagem de genes, devida a qualquer mutação de perda de função. A perda de heterozigotia está associada a fenótipos anómalos, porque o produto do gene remanescente é insuficiente.

Heterozigotia - Um indivíduo designa-se heterozigótico se, para uma determinada característica, possui dois alelos diferentes (manifesta-se sempre o alelo dominante).

Hiperplasia - Aumento de tamanho de um órgão ou tecido, causada pela multiplicação do número de células.

Metaloproteinases - Constituem uma família de enzimas do grupo de proteinases.

Microfibrilas - Estão presentes nas fibras elásticas que são responsáveis pela resiliência de tecidos como os pulmões, pele e grandes vasos.

Mosaicismo - Um indivíduo ou tecido com pelo menos duas linhagens celulares que diferem em genótipo ou cariótipo, derivadas de um único zigoto.

Mutação - Alteração numa sequência de ADN.

Mutação *de novo* - Uma nova mutação que não foi herdada de nenhum dos pais.

Mutação de *splicing* - cria ou destrói o sinal de *splicing* normal de exão-intrão.

Mutação *missense* - Codifica para um aminoácido diferente.

Mutação *nonsense* - quando a troca de nucleótidos leva à criação de um codão STOP a meio da cadeia de mRNA levando à formação de uma cadeia peptídica mais curta e provavelmente não funcional.

Nucleótidos - são os blocos construtores dos ácidos nucleicos: o ADN e o ARN.

Pontuação Sistémica - Dado que muitas manifestações da síndrome de Marfan podem surgir com a idade, não é aconselhável estabelecer diagnósticos alternativos definitivos em indivíduos com menos de 20 anos de idade, que têm manifestações físicas compatíveis mas insuficientes para o diagnóstico de síndrome de Marfan.

População de risco - Uma porção de indivíduos da população em geral que estão afetados com uma doença em particular ou são portadores da doença. Muitas vezes discutida no processo de aconselhamento genético como uma comparação com o risco pessoal do doente, dado o seu histórico familiar ou outras circunstâncias.

Predições *in silico* - Através de análise computacional, os programas prevêem se uma dada alteração no ADN poderá ser patogénica ou não.

Primers - São segmentos de ácidos nucleicos complementares do ADN. São usados para o início da replicação do ADN.

Teste preditivo - Fornece informação sobre se um indivíduo irá ou não desenvolver ou apresenta maior predisposição de desenvolver um problema específico, geralmente numa fase tardia da sua vida. Permite saber se um indivíduo é ou não portador de uma mutação previamente identificada na família.

Tropoelastina- é uma proteína que faz parte da matriz extracelular e é a precursora da elastina.

Z-score – Dilatação da Aorta – O tamanho da aorta deve ser normalizado tendo em conta a idade e tamanho do indivíduo para uma interpretação mais precisa. O Z-score ≥ 2.0 infere um valor igual ou superior ao percentil 95, enquanto um Z-score ≥ 3.0 infere um valor igual ou superior ao percentil 99.

1 INTRODUÇÃO

1.1 O que é a síndrome de Marfan?

Em 1896, um pediatra francês, Antoine Marfan, diagnosticou pela primeira vez a síndrome de Marfan (MFS) numa criança de 5 anos¹ com várias anomalias esqueléticas, realçando o excessivo crescimento dos ossos longos. Posteriormente, outras manifestações foram sendo reconhecidas como parte integrante do que hoje designamos como síndrome de Marfan (OMIM #154700).²

A síndrome de Marfan é uma doença hereditária do tecido conjuntivo, com manifestações multissistémicas, envolvendo os sistemas esqueléticos (grande crescimento dos ossos, laxidez articular), cardiovascular e ocular (miopia em 60% dos casos). As principais causas de morbidez e de mortalidade precoce estão no entanto associadas ao sistema cardiovascular, nomeadamente dilatação da aorta descendente, disseção da aorta descendente e prolapso da válvula mitral. As estimativas mais recentes apontam para uma prevalência de 1:5000.^{2,3}

Ainda que existam casos raros de recém-nascidos gravemente afetados, os sintomas de síndrome de Marfan desenvolvem-se durante as duas primeiras décadas de vida.²

1.2 Fisiopatologia

1.2.1 A identificação do gene *FBNI*, que codifica a glicoproteína fibrilina-1

O gene *FBNI* codifica a proteína chamada fibrilina-1, o principal componente das microfibrilas. Estas desempenham um papel importante na deposição da tropoelastina e na formação de fibras elásticas, além de possuírem uma função de suporte em alguns tecidos.³ A pele e a aorta de pacientes com MFS mostram uma diminuição do conteúdo de fibras elásticas.^{3,4}

O gene *FBNI* está localizado no braço longo (q) do cromossoma 15, na posição 21.1 (Figura 1).

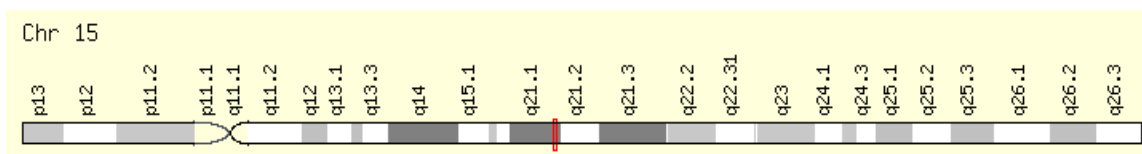


Figura 1 - Localização do gene *FBNI* no cromossoma 15.⁶

O gene *FBNI*, primeiro estimado com 110kb, agora com mais de 230kb (*Human Genome Sequencing Project NT 034890 sequence*), é altamente fragmentado em 65 exões, transcritos em 10kb de mARN, que codifica 2871 aminoácidos (aa).⁷

Sakai⁸ e a sua equipa foram os primeiros a identificar a fibrilina-1 como o principal componente de microfibrilas da matriz extracelular (Figura 2), presente em todos os tecidos com manifestações fenotípicas da doença. Em 1991, uma análise mutacional do gene *FBNI* em pacientes com MFS resultou na identificação de mutações *missense de novo*, idênticas em dois pacientes não relacionados. A maioria das famílias tem mutações únicas ou privadas.^{3,4}

As mutações afetam a síntese, o processamento, a secreção, a polimerização ou a estabilidade da fibrilina-1. Estudos de deposição da fibrilina-1 e ensaios de expressão em cultura de células sugeriram uma patogenia dominante negativa, ou seja, a produção de fibrilina-1 mutante inibe a formação de microfibrilas normais pela fibrilina-1 normal, ou estimula uma proteólise inapropriada de microfibrilas extracelulares. Evidências mais recentes, obtidas de modelos de síndrome de Marfan em murganhos sugerem que metade da quantidade normal de fibrilina-1 não é o suficiente para iniciar uma polimerização microfibrilar eficaz. Portanto, a haploinsuficiência pode também colaborar para a patogenia da doença.^{3,4,9}

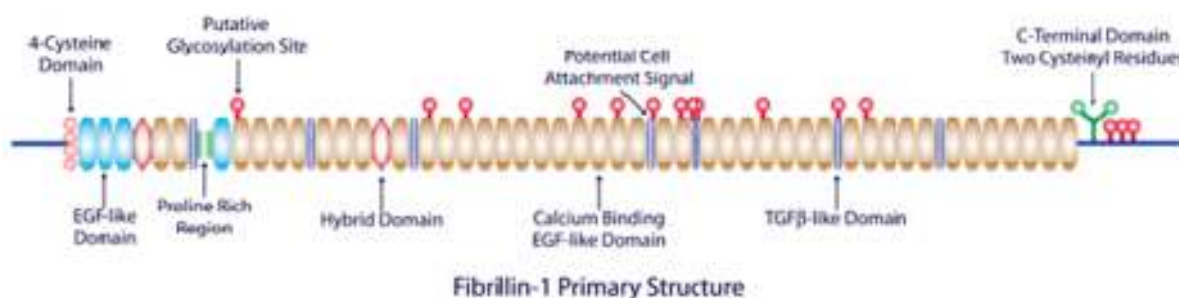


Figura 2 - Estrutura primária da Fibrilina-1.¹⁰

As microfibrilas são necessárias para manter as fibras elásticas durante a vida pós-natal. Na ausência de ligações próprias entre fibras elásticas e células do músculo liso vascular mediadas por fibrilina-1, as células adotam um repertório sintético anormal que inclui enzimas que degradam a matriz, como as metaloproteinases 2 e 9. Eventos subsequentes incluem calcificação das fibras elásticas, inflamação da parede vascular, hiperplasia

íntima devido à migração e proliferação das células do músculo liso vascular e colapso estrutural da parede dos vasos.^{3,4,9,11}

1.3 Genética

O gene *FBNI* é o único gene que está associado à síndrome de Marfan clássica.²

A informação mais importante do gene *FBNI* foi obtida através da *homepage* GeneCards® (genecards.org). Nesta base de dados está contida toda a informação necessária sobre o gene, a proteína e os nucleótidos.

A base de dados mais usada para a síndrome de Marfan é a *UMD-FBNI Locus Specific Database*, onde se encontram inúmeras informações a vários níveis sobre as mutações já descritas, informações sobre o gene (exões e número de codões), proteína (*wildtype* e aminoácidos mutados) e informações clínicas (grupos fenotípicos).¹²

A MFS tem uma transmissão autossômica dominante (Figura 3),³⁹ sendo que aproximadamente 75% dos indivíduos com MFS têm um progenitor afetado e aproximadamente 25% dos casos índice com MFS têm uma mutação *de novo*. O risco para os irmãos do caso índice depende do *status* dos progenitores. Se um progenitor é afetado, o risco é de 50%. Se uma criança afetada tem progenitores clinicamente não afetados, é provável que a criança tenha uma mutação *de novo* e o risco de transmissão aos irmãos é muito inferior a 50% mas superior ao risco da população em geral, dados os raros casos reportados de mosaïcismo somático e germinal. É possível fazer testes pré-natais a gestantes com risco aumentado, caso exista conhecimento de uma variante patogénica na família.²

O tipo de mutação mais frequentemente encontrada é a mutação *missense* (codifica para um aminoácido diferente), que resulta na síntese de uma fibrilina defeituosa, mas capaz de formar um polímero. As mutações *nonsense*

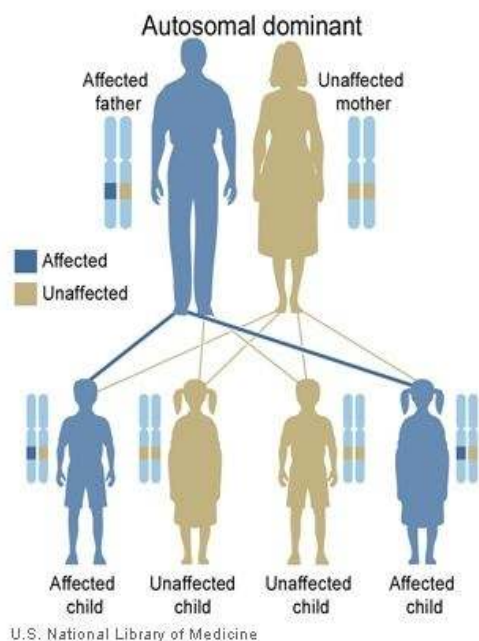


Figura 3 - Doença autossômica dominante.³⁹

originam codões STOP prematuros e, quando a proteína é traduzida, a fibrilina-1 apresenta-se incompleta e mais curta do que a normal e, consequentemente, a maioria das mutações *nonsense* dão origem a proteínas não funcionais.¹³ Em casos raros, poderão ser encontrados grandes rearranjos do gene.²

1.4 Diagnóstico da doença

O diagnóstico clínico de MFS é feito com base na história familiar e pela observação de achados característicos em múltiplos sistemas (Tabela 1). O diagnóstico depende da identificação de um conjunto de critérios clínicos, designados de *Ghent*. A subluxação do cristalino e o aneurisma da aorta são os achados mais significativos, *critérios major*, para o diagnóstico de MFS, dada a especificidade relativa ou frequência e significância clínica.²

1.4.1 Critérios de diagnóstico *Ghent*

Os critérios de diagnóstico colocam mais peso sobre as manifestações cardiovasculares e oftálmicas da doença.^{2,14}

1.4.1.1 Caso índice

Na ausência de qualquer história familiar, a presença dos critérios *major* são suficientes para o diagnóstico inequívoco de MFS.

Na ausência de uma destas duas características fundamentais, é necessária a presença de uma mutação no gene *FBNI*.

1.4.1.2 No caso de ausência de história familiar de MFS, o diagnóstico pode ser estabelecido no caso índice, de acordo com quatro cenários:

- Dilatação da Aorta (Z-score ≥ 2.0) e uma das seguintes:
 - Subluxação do cristalino
 - Uma variante patogénica no gene *FBNI*
 - Pontuação sistémica ≥ 7
- Subluxação do cristalino e uma variante patogénica no gene *FBNI* associado à dilatação da aorta.

1.4.1.3 Na presença de história familiar (usando estes critérios), o diagnóstico pode ser estabelecido para um familiar direto do caso índice, usando três cenários:

- Subluxação do cristalino
- Pontuação sistémica ≥ 7
- Dilatação da aorta (Z-score ≥ 2.0 com idade ≥ 20 anos ou ≥ 3.0 com idade < 20 anos)^{2,14}

Tabela 1 - Critérios de diagnóstico para a Síndrome de Marfan.¹⁵

Sistema	Critérios major	Critérios minor
Esquelético (Necessário 4 para critério major)	<ul style="list-style-type: none"> • <i>Pectus excavatum</i> necessitando de cirurgia • <i>Pectus carinatum</i> • Pés planos • Sinal do punho e polegar • Escoliose $> 20^\circ$ ou Espondilolistesis • Comprimento total dos membros superiores em relação à altura do doente > 1.05 • <i>Protrusio acetabulae</i> (RX, RM) • Extensão reduzida dos cotovelos ($< 170^\circ$) 	<ul style="list-style-type: none"> • <i>Pectus excavatum</i> moderado • Arcada do palato estreita e elevada • Fácies típica • Hiper mobilidade das articulações
Ocular	<ul style="list-style-type: none"> • Luxação do cristalino 	<ul style="list-style-type: none"> • Aplanamento da córnea (Queratometria) • \uparrow Comprimento axial do globo ocular (Ecografia) • Hipoplasia da íris ou do músculo ciliar causando miose
Cardiovascular	<ul style="list-style-type: none"> • Dilatação da aorta ascendente, com ou sem regurgitação, envolvendo pelo menos, os seios de Valsalva. • Dissecção da aorta ascendente 	<ul style="list-style-type: none"> • Prolapso da válvula mitral com ou sem regurgitação valvular mitral • Dilatação do tronco da artéria pulmonar, na ausência de estenose valvular ou pulmonar periférica ou de outra causa óbvia, antes dos 40 anos • Calcificação do anel mitral antes dos 40 anos • Dilatação ou dissecção da aorta descendente, torácica ou abdominal, antes dos 50 anos
Respiratório	Nenhum	<ul style="list-style-type: none"> • Pneumotórax espontâneo • Bolhas apicais (Radiografia de tórax)
Pele	Nenhum	<ul style="list-style-type: none"> • Estrias • Hérnia recorrente ou incisional
Dura	<ul style="list-style-type: none"> • Ectasia dural lombosagrada (TAC ou RM) 	Nenhum
História Familiar	<ul style="list-style-type: none"> • Pai, mãe, irmão ou filho com critérios de diagnóstico • Presença de alelo afectado (materno ou paterno) • Presença de uma mutação no gene da fibrilina (FBN1) 	Nenhum

1.4.2 Apresentação clínica

1.4.2.1 Manifestações músculo-esqueléticas

De forma geral, os doentes adultos portadores de síndrome de Marfan apresentam estatura alta com desproporção entre os membros superiores e inferiores

(dolicoctenomia), deformidade torácica anterior (*pectus escavatum* ou *carinatum*), escoliose, pés planos, hiperextensibilidade articular, aracnodactilia, palato bem arqueado, dentes aglomerados, face longa e estreita.^{16,17,18}

O aumento do comprimento dos membros pode ser estimado pelo cálculo do comprimento do membro inferior (do ramo púbico até ao chão) dividido pelo comprimento do membro superior (altura menos o comprimento do membro inferior). Esta relação de envergadura/altura varia com a idade durante o crescimento normal, mas na pessoa afetada pela MFS é normalmente pelo menos dois desvios-padrão abaixo da média para idade, raça e sexo. A relação envergadura/altura pode ser exagerada devido a alterações promovidas pela escoliose ou cifose anormal. A aracnodactilia apresenta-se em numerosas outras síndromes e permanece de forma geral como uma característica subjetiva.¹⁹ Existem técnicas simples como o sinal Steinberg (Figura 4)²⁰ e o sinal do punho de Walker-Murdoch (Figura 5),²⁰ que são auxiliares quando positivos. Porém, estas manobras estão sujeitas a interpretação do observador e podem refletir a elasticidade longitudinal da mão em vez de aracnodactilia.¹⁹



Figura 4 - Sinal Steinberg.²⁰



Figura 5 - Sinal de Walker-Murdoch.²⁰

O aumento do crescimento longitudinal das costelas produz deformidades no tórax anterior: depressão (*pectus escavatum*) (Figura 6)²¹ ou protrusão (*pectus carinatum*) do esterno (Figura 7).²¹

Figura 6 - *Pectus carinatum*.²¹Figura 7 - *Pectus excavatum*.²¹

Nestes casos o tórax é frequentemente assimétrico, com a alteração da fixação das articulações costochondrais (normalmente à esquerda). A deformidade do tórax anterior pode mudar durante o crescimento dos arcos costais. Um *pectus excavatum* moderado numa criança poderá evoluir negativamente em alguns anos, podendo ficar assimétrico, ou ainda converter-se num defeito de *pectus carinatum*.¹⁹ A flexibilidade articular está frequentemente presente, mas tem pouca especificidade diagnóstica. Os dedos, pulsos, cotovelos e joelhos (*genu recurvatum*) são geralmente hiperextensivos nestes doentes. O relaxamento dos ligamentos carpais produz pés planos (*pes planus* com ou sem calcâneo plano valgo).¹⁹

1.4.2.2 Manifestações cardiovasculares

As alterações cardiovasculares incluem o prolapso da válvula mitral e insuficiência mitral, sobrecarga ventricular esquerda e insuficiência cardíaca, dilatação da artéria pulmonar, dilatação do arco aórtico e insuficiência aórtica. Aproximadamente 60% dos adultos podem apresentar essas anomalias cardiovasculares, sendo as lesões de caráter progressivo. As complicações mais importantes (Figura 8) decorrem da dilatação e consequente insuficiência aórtica, progressão para aneurisma, disseção e rutura, cujo risco cresce substancialmente com diâmetros aórticos acima de 5,5 cm ao nível do seio de Valsalva (seios aórticos), culminando com morte súbita.^{17,22}

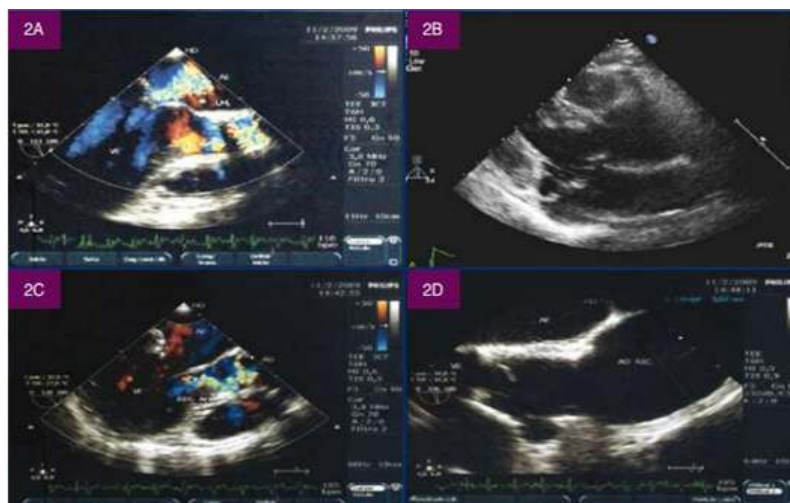


Figura 8 - Ecocardiograma transesofágico em paciente com MFS. A) Insuficiência mitral; B) Prolapso mitral; C) Insuficiência aórtica; D) Dilatação aneurismática da aorta ascendente.²³

1.4.2.3 Manifestações oftalmológicas

Os achados oculares mais comuns são a miopia e a subluxação do cristalino^{16,18} (Figura 9), que consiste no posicionamento incorreto do cristalino a partir da sua localização anatômica correta. O cristalino é a lente do olho, responsável por focalizar os raios de luz sobre a retina, na qual a imagem é formada.¹⁶



Figura 9 - Subluxação do cristalino.²⁴

1.4.2.4 Manifestações dermatológicas

A anomalia predominante da pele são as estrias atróficas, geralmente localizadas acima dos ombros, região lombar e quadris laterais. As estrias gestacionais podem ser características de mulheres com MFS. A pele pode ser hiperextensível.¹⁹

1.5 Diagnóstico diferencial

Muitas das características do esqueleto associadas à síndrome de Marfan são comuns à população em geral. A combinação destas características severas, normalmente indica uma doença do tecido conjuntivo (Tabela 2).²⁵

Tabela 2 - Diagnóstico diferencial.^{2,25,40}

Diagnóstico diferencial	Expressão	Achados comuns	Achados diferenciais	Teste diferencial	Etiologia
Síndrome familiar do aneurisma torácico da aorta	Disseção da aorta e aneurisma da aorta.	Aneurisma torácico da aorta.	Sem achados oculares ou músculo-esqueléticos. Sem manif. sistêmicas de MFS, história familiar relevante de disseção.	Sem teste diferencial	Quebra da matriz extracelular da elastina e colagénio pelas proteases, tais como collagenase, elastase, várias metaloproteinases da matriz e plasmina.
Válvula bicúspide da aorta e aneurisma da aorta ascendente	Dilatação máxima na aorta ascendente depois da junção sinotubular.	Ocorre ocasionalmente na MFS.	Sem achados oculares ou músculo-esqueléticos.	ECO, TAC, ressonância magnética.	Produção inadequada de fibrilina-1.
Síndrome de Ehlers-Danlos (EDS)	Doenças do tecido conjuntivo, síntese anormal de colagénio. Afeta a pele, ligamentos, articulações, veias e outros órgãos. Prolapso da válvula mitral.	Aneurisma da aorta ou disseção da aorta a qualquer idade.	Tipo IV afeta mais frequentemente a aorta, aumento de nódos negros.	Biópsia de pele para determinação de colagénio e testes de ADN para mutações no gene <i>COL5A1</i> .	EDS Tipo IV (mutações no gene colagénio tipo III), EDS VI (composto het. e homo. no gene lisil hidroxilase), EDS VIIA e VIIB (mutações no gene colagénio tipo I), EDS VIIC (deficiência de procologénio N-protease e EDS IX (diminuição da atividade da lisil oxidase).
Doença de Erdheim	Perda de elasticidade e fibra muscular na aorta média, com acumulação de muco polissacárido.	Dilatação ou rutura da aorta.	Sem achados oculares ou músculo-esqueléticos. Sem história familiar.	Sem teste diferencial.	Incerta
Homocistinúria	Morfologia Marfanoide, <i>ectopia lentis</i> , atraso mental e osteoporose.	<i>Ectopia lentis</i> .	Deficiência de cistationina β sintetase. Estatura alta, ossos muito compridos e <i>ectopia lentis</i> , mas normalmente sem aumento ou disseção da aorta.	Concentrações aumentadas de homocisteína no plasma.	Mutações nos genes <i>CBS</i> , <i>MTHFR</i> , <i>MTR</i> e <i>MTRR</i> .

Tabela 2 - Diagnóstico diferencial (cont.).

Diagnóstico diferencial	Expressão	Achados comuns	Achados diferenciais	Teste diferencial	Etiologia
Síndrome Loays-Dietz	Doença genética que afeta as veias, especialmente a aorta.	Dilatação da aorta, aneurisma e disseção e prolapso da válvula mitral.	Sem associação ao deslocamento do cristalino, disseção da aorta ocorre numa dimensão muito mais pequena. Úvula bífida, tortuosidade arterial e hipertelorismo.	De momento não está disponível.	Mutações nos genes que codificam os fatores de crescimento β receptor 1 (<i>TGFBR1</i>) e 2 (<i>TGFBR2</i>).
Síndrome Shprintzen-Goldberg	Craniossinostose, caract. craniofaciais distintas, deformidade esquelética, anomalias neurológicas, atraso mental médio a moderado e anomalias cerebrais.	Prolapso da válvula mitral, regurgitação mitral e regurgitação aórtica.	Provavelmente não será encontrada dilatação da raiz da aorta.	De momento não está disponível.	Incerto, mas possivelmente mutações na fibrilina-1.
Fenótipo MASS	Prolapso da válvula mitral, dilatação média da aorta, estrias atroficas e envolvimento esquelético.	Prolapso da válvula mitral, dilatação da raiz da aorta e alterações na pele e esqueleto.	Membros longos, deformidade da caixa torácica, estrias atroficas, prolapso da válvula mitral e dilatação leve e não-progressiva da raiz da aorta.	Um acompanhamento cuidadoso para distinguir o fenótipo MASS de MFS, especialmente em crianças.	Mutações na Fibrilina-1.
Síndrome de Beals	Várias contraturas de flexão, aracnodactilia, cifoescoliose grave, forma da orelha anormal e hipoplasia muscular.	Características do esqueleto com MFS, tais como a morfologia marfanoide, aracnodactilia, camptodactilia e cifoescoliose	Múltiplas contraturas articulares (especialmente cotovelo, joelho e articulações dos dedos), e orelhas deformadas na ausência de importante dilatação da raiz da aorta são característica da síndrome de Beals e raramente encontrada na MFS.	Aparência amarrotada de hélice da orelha e contraturas congénitas, normalmente sem complicações oculares e cardiovasculares.	Mutação no gene <i>FBN2</i> no cromossoma 5q23.

Tabela 2 - Diagnóstico diferencial (cont.).

Diagnóstico diferencial	Expressão	Achados comuns	Achados diferenciais	Teste diferencial	Etiologia
<i>Ectopia lentis isolada</i>	Deslocação do cristalino, ocorre à nascença.	<i>Ectopia lentis</i> , pode estar associado a achados esqueléticos médios.	Atraso mental, mobilidade articular diminuída e articulações rígidas, mas sem anomalias cardiovasculares	Não.	Mutações na Fibrilina-1.
Síndrome de Stickler	Hiperflexibilidade nas articulações, características faciais típicas, perda de audição e miopia.	Estatura alta, prolapso da válvula mitral e deslocamento de retina.	Retrognatia, hipoplasia facial, sem o envolvimento da aorta.	Não.	Mutações no gene <i>COL2A1</i> no cromossoma 12 na região 12q13.11-q13.2.
Síndrome Klinefelter (47, XXY)	Insuficiência testicular, infertilidade, baixa testosterona, disfunção erétil e densidade mineral óssea baixa.	Morfologia marfanoide.	Testículos e genitália pequenos e dificuldade de aprendizagem.	Elevados níveis de FSH no soro.	Mutações no gene <i>FGFR3</i> .

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Amostra

Neste estudo foi analisada uma amostra de 43 doentes clinicamente diagnosticados com MFS em consultas de vários hospitais portugueses (Tabela 3). Destes, 33 correspondem a casos índice e 10 correspondem a casos familiares preditivos.

Tabela 3 - Casos e informações clínicas.

Amostra	Data de Nascimento	Hospital	Informação clínica	Caso
Caso 1	14-08-1966	HSM	Com aneurisma da aorta e diagnóstico de MFS Progenitor com MFS; Irmão morreu com rutura da aorta.	Índice
Caso 2	04-05-1966	HSM	—	Índice
Caso 3	29-04-1969	HSM	Irmão de caso 1 com duas variantes no gene <i>FBN1</i> : c.5789-2A>G e c.6700G>A; Progenitor com MFS; irmão morreu com rutura da aorta.	Preditivo
Caso 4	11-11-1972	HSM	Suspeita morfológica e ecocardiografia de MFS.	Índice
Caso 5	03-07-1977	HSM	—	Índice
Caso 6	14-12-2009	PART	—	Índice
Caso 7	24-04-1971	HSM	Prolapso da válvula mitral; MFS.	Índice
Caso 8	23-01-1974	HSM	Quadro clínico de MFS; Curva da aorta dilatada; Prolapso da válvula mitral, Escoliose; Miopia.	Índice
Caso 9	02-07-1982	HSM	Doença vascular, falso aneurisma VE; Falso aneurisma da artéria renal.	Índice
Caso 10	10-06-1951	HSM	Dissecção da aorta e aneurisma da artéria abdominal; Alteração do cristalino/miopia; Alteração de tecidos do esqueleto.	Índice

Tabela 3 - Casos e informações clínicas (cont.).

Amostra	Data de Nascimento	Hospital	Informação clínica	Caso
Caso 11	15-06-1989	HSM	Poliartralgia, episódios febris repetitivos com tendinites diversas e hiperlaxidão articular; Sem cardiopatia conhecida ou alterações oculares.	Índex
Caso 12	05-06-1985	HSM	Morfotipo de MFS.	Índex
Caso 13	05-06-1992	HSM	—	Índex
Caso 14	02-02-1976	HSM	—	Índex
Caso 15	20-01-1984	H_FERNFONS	Eventual MFS (prolapso da válvula mitral, hipoacúsia e morfotipo).	Índex
Caso 16	29-06-1945	HSM	Suspeita de MFS.	Índex
Caso 17	01-03-1978	HSM	Síndrome coronário agudo em doente jovem; Sem fatores de risco cardiovascular.	Índex
Caso 18	08-07-2008	HSM	Filha do caso 5	Preditivo
Caso 19	03-01-1970	H_SFXAVIER	Submetida a correção de aneurisma da aorta; Doente internada na UAVC por AVC isquémico pós-operatório; Antecedentes familiares de morte súbita de irmão de 42 anos.	Índex
Caso 20	12-05-1958	HSM	Critérios clínicos para MFS.	Índex
Caso 21	01-04-1966	HSM	MFS (dissecção da aorta).	Índex
Caso 22	01-04-1974	HSM	—	Índex
Caso 23	29-01-1975	HSM	Doente com padrão de Brugada no ECG com CDI colocado em 2010; Eco com aneurisma da raiz da aorta, <i>pectus excavatum</i> ; Síndrome Marfanoide?	Índex
Caso 24	08-10-1960	HSM	—	Índex
Caso 25	08-08-1972	HSM	—	Índex
Caso 26	28-12-1987	HSM	Suspeita de Ehlers-Danlos.	Índex
Caso 27	—	HSM	Dissecção da aorta tipo A.	Índex

Tabela 3 - Casos e informações clínicas (cont.).

Amostra	Data de Nascimento	Hospital	Informação clínica	Caso
Caso 28	18-04-2013	HSM	Pesquisa de mutação identificada noutra laboratório, encontrada na progenitora c.5912G>A (p.Lys1971Tyr) no exão 47.	Preditivo
Caso 29	—	HSM	Pesquisa de mutação identificada noutra laboratório, encontrada na progenitora c.5912G>A (p.Lys1971Tyr) no exão 47. Irmão de caso 28.	Preditivo
Caso 30	24-10-1972	HG-HORTA	Crítérios clínicos para MFS; Alterações oculares.	Índex
Caso 31	13-04-1973	HSM	Quadro clínico de MFS.	Índex
Caso 32	19-03-1952	HSM	Irmão falecido com MFS.	Preditivo
Caso 33	19-12-1955	HSM	—	Índex
Caso 34	12-03-1985	HSM	Suspeita de MFS.	Índex
Caso 35	11-10-1953	HSM	Quadro clínico de MFS; Progenitor de caso 31 com MFS.	Preditivo
Caso 36	05-10-1974	HSM	MFS (fenótipo positivo); Irmã de caso 31 com MFS.	Preditivo
Caso 37	28-04-1958	HSM	—	Índex
Caso 38	20-01-1995	HDFF	Com prolapso de válvula mitral; Aracnodactilia; Escoliose da coluna dorsal; Ansiedade extrema; Alterações na ferritina descritas no MFS.	Índex
Caso 39	26-01-2000	HSM	Suspeita de MFS; Irmão do caso 30, com mutação c.1766A>G (p.Asn589Ser).	Preditivo
Caso 40	04-01-2014	HSM	Filho de caso 34 com mutação identificada. Pesquisa da variante c.4348T>A (p.Cys1450Ser).	Preditivo

Tabela 3 - Casos e informações clínicas (cont.).

Amostra	Data de Nascimento	Hospital	Informação clínica	Caso
Caso 41	10-06-1947	HSM	Disseção da aorta torácica e abdominal.	Índex
Caso 42	13-01-1941	HSM	Pesquisa das variantes c.5789-2A>G e c.6700G>A no gene <i>FBNI</i> previamente encontradas numa sobrinha (caso 1) com síndrome de Marfan.	Preditivo
Caso 43	12-09-1952	HSM	Rutura da aorta em 2005.	Índex

2.2 Extração de ADN

A extração de ADN a partir de sangue periférico foi feita através de um método *in house*. Todo o procedimento de extração foi realizado numa câmara de segurança biológica II-A. Os eritrócitos presentes na amostra foram lisados por incubação com uma solução hipotónica, *Red Cell Lysing Buffer* (RCLB) – (NH₄Cl, Calbiochem® #168320; KHCO₃, Merck® #1.04854.0500; EDTA, Sigma® #E-5134) durante 20 minutos em gelo, recuperando-se os linfócitos por centrifugação (8 minutos, 2000g). Seguidamente procedeu-se à lise dos linfócitos, usando uma solução de lise celular (EDTA, Sigma® #E-5134; SDS, Fluka® #71725) e à precipitação das proteínas usando solução de precipitação de proteínas (acetato de amónio, UBS® #11251) não agressiva para o ADN, as quais foram separadas da solução através de centrifugação (20 minutos, 2500g). Finalmente o ADN foi precipitado com isopropanol (2-propanol, Merck® #1096341000) e removeram-se os sais minerais eventualmente presentes com etanol a 70% (v/v) (Etanol absoluto, Merck® #1.00983.2511). O ADN obtido foi dissolvido em TE (Tris 10mM; EDTA 0,1mM).

2.3 Quantificação do ADN

O ADN foi quantificado utilizando um espectrofotómetro de espectro completo (220-750 nm), *NanoDrop*® ND-1000 (*NanoDrop*® Technologies).

O ADN absorve radiação entre 220 e 320 nm, apresentando absorvância máxima nos 260 nm. Medições simultâneas a 230 nm e 280 nm foram realizadas, de forma a obter as seguintes proporções:

$$R_1 = \frac{Abs_{260nm}}{Abs_{280nm}} \quad R_2 = \frac{Abs_{260nm}}{Abs_{230nm}}$$

A partir da análise espectrofotométrica, valores de $R_1 \approx 1,8$ e $1,8 < R_2 < 2,2$ devem ser observados, a fim de ser considerada uma solução de ADN de alta pureza.²⁶

Um baixo valor de R_1 ou R_2 pode ser causado pela presença de proteínas, fenol ou outro reagente associado com o protocolo de extração. Um alto valor de R_1 não é indicativo de um problema; no entanto, um elevado valor de R_2 pode ser o resultado de uma leitura de branco contaminado ou do uso de uma solução inadequada para a medição do branco.²⁶

Após a quantificação, o ADN foi diluído para 100-150ng/μl e armazenado a 4 °C, enquanto o ADN *stock* foi armazenado a -20 °C.

2.4 Pesquisa de mutações

A pesquisa de mutações no gene *FBNI* (15q21.1, OMIM #154700, NM_000138.4) foi realizada através de *polymerase-chain-reaction* (PCR), usando *primers* intrônicos específicos (anexo 1), seguida de sequenciação dos produtos de PCR (*Sanger Sequencing*, *ABI Prism 3100-Avant Capillary Array*, 36cm, *Applied Biosystems*), usando *BigDye v3.1 sequence kit* (*Applied Biosystems*). Foram seguidas as *HGVS guidelines* para descrever as variantes encontradas nos doentes. Toda a zona codificante do gene (exões e regiões de junção intrão-exão) foi analisada.

O transcrito usado foi o ENST00000316623, com a sequência nucleotídica de referência NM_000138.4 e a sequência proteica NP_000129.3. O número de identificação da Uniprot usado foi o P35555.

2.5 Condições dos PCRs

Para a amplificação da maioria dos exões do gene *FBNI* foi seguido o protocolo *standard* para a execução de PCRs (Tabela 4), utilizando a polimerase de ADN BioTaq (*Bioline*, #Bio-21040) e desoxirribonucleotídeos trifosfatados (dNTPs) a partir de uma solução de trabalho a 2mM (*Bioline*, #Bio-39028), contendo nucleótidos à concentração de 25mM cada).

No entanto, quando são observados produtos inespecíficos de amplificação, pode fazer-se uso de aditivos no PCR (i.e. DMSO, formamida, glicerol, gradiente de concentração de magnésio), como aconteceu no caso dos exões 1, 25-26, 27-28, 47-48 e 65 (Tabela 5), em que foi adicionado 1,25µl de DMSO. Para amplificar o exão 21-22, foi necessário adicionar 1,25µl de DMSO e 1µl de MgCl₂ a 50mM (Tabela 6). De forma a conseguir amplificar os exões 31 e 58-59 foi usada a enzima *Amplitaq Gold*[®] (*Applied Biosystems*, #4311818), juntamente com o tampão e magnésio respetivos (Tabela 7). Estes pequenos acertos no protocolo de PCR são feitos de forma a melhorar a especificidade do produto de PCR e/ou aumentar a qualidade do produto obtido para facilitar a sequenciação.

As enzimas estão inativas a temperaturas baixas e só começam a sua atividade depois da desnaturação inicial, prevenindo a amplificação de fragmentos inespecíficos e *annealing* inespecífico dos *primers*.

Nas reações de PCR foram usadas 100-150ng de ADN molde e um controlo negativo por exão. Desde modo, assegurou-se que só a amostra de ADN foi amplificada e foram excluídas contaminações.

As condições de PCR englobaram um passo de desnaturação inicial a 96°C durante 5 minutos, seguido de 35 ciclos de desnaturação a 94°C durante 30 segundos, *annealing* a uma temperatura específica para cada exão durante 30 segundos, extensão a 72°C durante 45 segundos e por fim uma extensão final a 72°C por 10 minutos (Tabela 8). Estas condições de PCR foram realizados no termociclador *Veriti*[®]. No caso dos exões 47-48 as condições do PCR foram exatamente iguais às condições de sequenciação, ou seja, uma desnaturação inicial a 96°C durante 1 minuto, seguida de 25 ciclos de desnaturação a 96°C durante 10 segundos e *annealing* e extensão a 60°C durante 4 minutos (Tabela 10). Este PCR foi realizado no termociclador *Biometra*.

Tabela 4 - *Mix de PCR standard.*

Mix de PCR	
Reagente	Volume/ μ l
H ₂ O	16,95
Tampão10X	2,5
dNTPs, 2mM	2,5
MgCl ₂ , 50mM	0,75
Primer Flexão*	1,25
Primer R/ exão*	1,25
BioTaq Bioline	0,1
Total	24 μ l

Tabela 5 - *Mix de PCR com 1,25 μ l de DMSO.*

Mix de PCR fragmentos 1, 25-26, 27-28, 47-48, 65	
Reagente	Volume/ μ l
H ₂ O	15,7
DMSO	1,25
Tampão10X	2,5
dNTPs, 2mM	2,5
MgCl ₂ , 50mM	0,75
Primer Flexão*	0,6
Primer R/ exão*	0,6
BioTaq Bioline	0,1
Total	24 μ l

Tabela 6 - *Mix de PCR com 1,25 μ l de DMSO e 1 μ l de MgCl₂.*

Mix de PCR fragmento 21-22	
Reagente	Volume/ μ l
H ₂ O	15,457
DMSO	1,25
Tampão10X	2,5
dNTPs, 2mM	2,5
MgCl ₂ , 50mM	1,0
Primer Flexão*	0,6
Primer R/ exão*	0,6
BioTaq Bioline	0,1
Total	24 μ l

Tabela 7 - *Mix de PCR com AmpliTaq Gold.*

Mix de PCR exão 31, 58-59	
Reagente	Volume/ μ l
H ₂ O	15,2
Tampão10X	2,5
dNTPs, 2mM	2,5
MgCl ₂ , 25mM	2,5
Primer Flexão*	0,6
Primer R/ exão*	0,6
AmpliTaq Gold	0,1
Total	24 μ l

Tabela 8 - Condições de termociclador.

	Temperatura	Duração	Nº Ciclos
Desnaturação Inicial	96°C	5 min	1
Desnaturação	94°C	30 seg	35X
Annealing	...*	30 seg	
Extensão	72°C	45 seg	
Extensão final	72°C	10 min	1
Hold	15°C		

2.6 Eletroforese

Depois das reações de PCR, os produtos das mesmas foram analisados em gel de agarose para verificar a especificidade da amplificação e excluir contaminações. Para os fragmentos serem visualizados, os mesmos foram corridos em gel de agarose e expostos à luz ultra-violeta (UV). Para tal, foi feito um gel de agarose a 2%, com 250 ml de tampão TAE (Tris base, ácido acético e EDTA) com 5 gramas de agarose e 6,25µl de corante *Greensafe Premium* (Nzytech, #MB13201). O *Greensafe* é um corante intercalante que cora a cadeia dupla de ADN de forma a que os fragmentos sejam visualizados quando expostos à luz UV. Para que os produtos de PCR fossem visualizados, foram adicionados a cada 5µl de produto de PCR 2µl de corante azul de bromofenol, com um volume total para aplicar no gel de agarose de 7µl. O gel foi submetido a corrente elétrica e visualizado à luz UV. O tamanho dos fragmentos esperados (anexo 1) foram confirmados por um marcador de massas moleculares *GeneRuler™ 100bp DNA Ladder* (Fermentas, #SM0241).

Após ter-se verificado que os PCRs amplificaram os exões respetivos e os controlos negativos não apresentaram qualquer contaminação, estes foram eliminados e os PCRs foram purificados.

2.7 Purificação dos produtos de PCR

Para a purificação dos produtos de PCR foi utilizado um sistema de vácuo, *Montage™ MultiScreen™ PCR₉₆ Cleanup Kit* (Millipore, #LSKM PCR50). Foram adicionados 80µl de água *Milli-Q* a cada produto de PCR, para um volume total de 100µl. O volume total de cada PCR foi transferido para um poço de uma placa de 96 poços com uma micropipeta multicanal de 100µl, com pontas de filtro. Esta placa contém uma membrana que separa o ADN dos restantes reagentes e, quando é submetida a vácuo, os produtos de PCR são absorvidos e o ADN fica preso na mesma enquanto o restante produto de PCR, de tamanho inferior ao do ADN, é eliminado. Assim que os poços se encontraram vazios, a placa foi retirada do vácuo *manifold* e foram adicionados 25µl de água *Milli-Q* aos poços respetivos. A placa foi colocada num agitador durante 15 minutos, para que o ADN através da força mecânica se desprendesse da membrana; de seguida foi recuperado o líquido de cada poço para um novo microtubo de 0,2ml, tendo como resultado final os produtos de PCR purificados.

2.8 Sequenciação

Para pesquisar mutações no gene *FBNI* foram feitas reações de sequenciação, usando o kit *Big Dye v3.1 Cycle Sequencing kit* (*Applied Biosystems*, #4336917). Foi preparada uma *mix* para o número de sequenciações a realizar, constituída pela mistura de *Big Dye*, tampão *Big Dye* e água *Milli-Q* (Tabela 9). Esta *mix* foi distribuída por microtubos de 0,2ml previamente identificados e, de acordo com essa mesma identificação, foi adicionado 0,5µl do respectivo *primer* e 1µl do produto de PCR purificado anteriormente.

As reações foram colocadas no termociclador *Biometra* com as seguintes condições: desnaturação inicial a 96°C durante 1 minuto, seguida de 25 ciclos de desnaturação a 96°C durante 10 segundos e por fim *annealing* e extensão a 60°C durante 4 minutos (Tabela 10).

Tabela 9 - *Mix* para reações de sequenciação.

Reagente	Vol p/ amostra	x 60
H ₂ O	6,375 µl	382,5 µl
<i>BigDye Terminator Sequencing Buffer</i> 5x	1,875 µl	112,5 µl
<i>BigDye Terminator</i> v3.1	0,25 µl	15 µl
Total	8,5 µl	510 µl

Tabela 10 - Condições do termociclador para a reação de sequenciação.

	Temperatura	Duração	Nº Ciclos
Desnaturação Inicial	96°C	1 min	1
Desnaturação	96°C	10 seg	25X
Annealing	60°C	4 min	
Extensão			
Hold	15°C		

Passado cerca de duas horas, as reações foram retiradas do termociclador. A eficiência da análise feita pelo sequenciador depende de uma prévia purificação das reações de sequenciação. Para tal, adicionaram-se 50µl de TE a cada reação e transferiu-se o volume total para uma placa de 96 poços (*Montage™ SEQ₉₆ Sequencing Reaction Cleanup Kit*, Ref. Millipore, #LSKS09624), com uma micropipeta multicanal de 100µl. De seguida, a placa foi colocada no vácuo *manifold* de forma a que todos os componentes como sais, dNTP's, ou *primers* que não foram incorporados na reação, fossem eliminados e não interferissem com a fluorescência emitida pela sequência que se quer analisar. Para aumentar a qualidade dos produtos, foi feita uma segunda lavagem adicionando 60µl de TE em cada poço e a placa colocada novamente no vácuo *manifold*. De seguida, a placa foi retirada do vácuo e foram adicionados 30µl de EDTA 0,1mM em cada poço. A placa ficou a agitar 15 minutos, de forma a ressuspender o produto purificado da membrana da placa. Após os 15 minutos, foi retirado o produto ressuspendido para uma placa de 96 poços própria para ser introduzida no sequenciador. Após a eletroforese capilar no sequenciador *ABI Prism 3100-Avant*, os resultados foram analisados através do programa *DNA Sequencing Analysis™ version 5.1* (*Applied Biosystems*) e os eletroferogramas foram impressos e armazenados em suporte informático.

O programa *Sequencher™* (v.5.2, *GeneCodes*) foi usado para alinhar e analisar as diferentes sequências do ADN dos doentes através da comparação destas com a sequência de referência do gene *FBNI*. Esta análise permite a identificação das variantes, patogénicas ou polimórficas, presentes em cada doente.

2.9 Programas de análise computacional *in silico*

De forma a determinar a patogenicidade das mutações encontradas neste estudo, foram usados 7 programas de análise computacional *in silico*. De acordo com o tipo de mutação, foram usados programas específicos. Para mutações *missense* foram usados: *Sift Blink®*, *UMD-Predictor®*, *SNPeffect 4.0®*, *SNPs&GO®*, *PolyPhen-2®* e *MutationTaster®*. As mutações *nonsense* foram analisadas pelo programa *MutationTaster®* e as mutações de *splicing* foram analisadas pelo *Human Splicing Finder®* e pelo *MutationTaster®*.

Os diferentes programas *in silico* utilizam algoritmos de predições diferentes.

2.9.1 **Sift Blink**[®]

A função do *SIFT* (*Sorting Intolerant From Tolerant*) é determinar o efeito funcional causado por substituições de resíduos de aminoácidos nas proteínas. O algoritmo utilizado pela ferramenta é baseado na premissa de que a evolução proteica está correlacionada com a função proteica. Portanto, o alinhamento de proteínas de uma mesma família deve mostrar a conservação de resíduos de aminoácidos localizados em posições importantes para a função proteica.

Através da *homepage* (http://sift.jcvi.org/www/SIFT_BLink_submit.html), colocou-se a sequência proteica NP_000129.3 e as posições e substituições de resíduos de aminoácidos. Inicialmente, a sequência proteica de entrada é usada pela ferramenta PSIBLAST (*Position-Specific Iterated BLAST*) para se recuperar sequências proteicas similares, assim como um alinhamento múltiplo de todas estas sequências. Em seguida, o algoritmo utiliza as sequências resultantes desta primeira busca que obtiveram um *score* de similaridade acima do limite de 90% para criar uma matriz de valores posição-específica (*position-specific scoring matrix*, *PSSM*) baseada no alinhamento destas sequências. Esta matriz tenderá a fornecer *scores* mais altos para regiões conservadas dentro deste conjunto de sequências estudadas e *scores* baixos para regiões pouco conservadas. Usando a matriz de valores posição-específica gerada, o algoritmo calcula as probabilidades normalizadas para todas as substituições de resíduos de aminoácidos possíveis em cada posição do alinhamento. As substituições que apresentam um valor de tolerância menor do que 0,05 são preditas intolerantes ou patogénicas, enquanto aquelas que apresentam um valor maior do que 0,05 são preditas tolerantes.²⁷

2.9.2 **UMD-Predictor**[®]

Este programa fornece um leque de probabilidade para uma dada alteração. Tem em conta a sua localização a nível da proteína, ou seja, em que domínio e se o aminoácido está envolvido numa função estrutural ou biológica. Verifica o grau de conservação e estima as diferenças das propriedades bioquímicas entre o aminoácido mutado e o *wild-type*.

Na *homepage* do *UMD-Predictor* (<http://umd-predictor.eu/>) colocou-se o ID do transcrito, ENST00000316623, e procedeu-se à análise. O programa apresenta todas as possibilidades na posição do aminoácido pretendido, categorizando as combinações por:

polimorfismo, com um *score* inferior a 50; provavelmente polimorfismo, com um *score* de 50 a 64; provavelmente patogénico, com um *score* 65 a 74; e patogénico, com um *score* acima de 74.²⁸

2.9.3 **The Human Splicing Finder**[®]

Este programa combina 12 algoritmos diferentes para identificar e prever os efeitos de *splicing* nos locais dadores e aceitadores do *splicing*. Através da *homepage* (www.umd.be/HSF3/), foi selecionada a opção “analisar a mutação” e colocou-se o ID do transcrito, ENST00000316623. De seguida, foi colocada a mutação de *splicing* a analisar e fez-se correr o programa que, consoante o resultado, apresenta diferentes interpretações.²⁹

2.9.4 **SNPeffect 4.0**[®]

O *SNPeffect* prevê o impacto das variantes na agregação de proteínas e formação amiloide, ligação de *chaperones* e estabilidade estrutural. O *SNPeffect* revela se a mutação vai estabilizar ou desestabilizar a estrutura da proteína. O programa obtém as informações sobre as estruturas das proteínas, cruzando referências com a *Uniprot* (*Universal Protein Resource*) e outras bases de dados conhecidas.³⁰

Na *homepage* (snpeffect.switchlab.org) colocou-se o *Uniprot ID* P35555, escolheu-se a posição do aminoácido e o aminoácido alterado e procedeu-se à análise. O programa categoriza as mutações como: não afeta a proteína ou afeta a proteína.

2.9.5 **SNPs&GO**[®]

O programa *SNPs&GO* foi otimizado para prever se uma variação pontual na proteína pode ser classificada como associada a doença ou neutra.

Na *homepage* do programa (<http://snps.biofold.org/snps-and-go/snps-and-go.html>), foi colocado o *Uniprot ID* P35555 e as mutações a analisar. Após vários algoritmos e análise de probabilidades, o programa apresenta dois resultados: *neutral variation*/polimorfismo e *Disease associated variation*/provavelmente patogénico.³¹

2.9.6 **PolyPhen-2**[®]

Este programa é uma ferramenta que prevê o possível impacto de uma substituição de um aminoácido na estrutura e função da proteína humana, utilizando simples considerações físicas e comparativas. Esta previsão é baseada em regras empíricas diretas que são aplicadas à sequência e à informação estrutural e filogenética que caracterizam a substituição. A previsão é efetuada pela análise de *scores* entre o aminoácido normal e o aminoácido alterado, sendo posteriormente calculado o valor da diferença entre os *scores* de ambas as variantes alélicas na posição polimórfica. Esta diferença pode variar entre zero, que corresponde a uma variação sem efeitos fenotípicos (variação benigna), e um valor superior a dois que corresponde a uma variação rara ou pouco observada na família da proteína (variação provavelmente patogénica).³²

Na *homepage* do programa (genetics.bwh.harvard.edu/pph2) colocou-se o ID do transcrito, ENST00000316623, a posição da mutação, o aminoácido correspondente à sequência normal da proteína e o aminoácido alterado.³²

2.9.7 **MutationTaster**[®]

O *MutationTaster* (mutationtaster.org) calcula a probabilidade de uma dada alteração ser patogénica ou ser um polimorfismo. Para essa predição, foram estudadas numa larga escala, composta por mais de 390.000 mutações patogénicas do *HGMDProfessional* e mais de 6.8000.000 *SNPs* e polimorfismos *indel* do *1000 Genomes Project (TGP)*, as frequências das alterações encontradas em indivíduos.³²

O *MutationTaster* fornece quatro modelos, destinados aos diferentes tipos de alterações:

- 1) Alterações silenciosas;
- 2) Alterações que levam a substituição/inserção/deleção de um único aminoácido;
- 3) Alterações mais complexas que levam à mudança do aminoácido na sequência (ex. mutações que levam a um codão STOP prematuro);
- 4) Alterações de *splicing*.

O *score* das alterações de aminoácidos é feito a partir de uma matriz de substituição de aminoácidos, que tem em conta as características físico-químicas dos mesmos e o *score* de substituições de acordo com o grau de diferença entre o original e o novo

aminoácido. Uma vez que esta matriz não fornece valores para inserção/deleção de aminoácidos, nenhum *score* é dado nestes casos.

Se a variante está sinalizada como provavelmente patogénica ou patogénica no *ClinVar* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/>) (arquivo de informações com suporte científico) é automaticamente associada a causadora de doença. Sempre que uma mutação patogénica descrita na base de dados HGMD (*The Human Genetic Mutation Database*) é encontrada na mesma posição que a variante, o mesmo é reportado no resultado.

O *MutationTaster* determina a posição de *splice site change* em relação à fronteira exão/intrão: se ocorrer a perda/diminuição de um *splice site* na fronteira exão/intrão ou intrão/exão, isto será considerado uma “verdadeira” mudança de *splice site*. Um ganho de um novo *splice site* é exibido, caso o *score* de confiança do local de união recém-formado seja superior a 0,3. Um aumento de um local de união já existente será exibido, se a alteração tiver um *score* de confiança superior a 10%.

A sequência de *Kozak* (gccRccAUGG; R = purina) começa *upstream* do codão de iniciação (AUG) e desempenha um papel importante na iniciação da tradução. A purina (R) na posição -3, bem como a G na posição 4, são altamente conservadas. O programa verifica se, para uma dada alteração, uma sequência previamente forte tiver sido enfraquecida.

Para a análise de conservação, sequências de aminoácidos ou nucleótidos homólogos de outras dez espécies (chimpanzé, *macacus rhesus*, rato, gato, galinha, *claw frog*, *pufferfish*, peixe-zebra, mosca da fruta e minhoca) são alinhados com a sequência humana correspondente do gene em questão. O *status* do alinhamento de sequências de nucleótidos ou aminoácidos é conservado ou não conservado.

A característica da proteína pode perder-se se um exão inteiro for silenciado, devido a uma mudança de *splice site*, ou se uma proteína é encurtada por causa de um codão STOP prematuro; nestes casos as características da proteína são indiretamente afetadas.³³

3 RESULTADOS

3.1 Resultados genéticos

Dos 43 doentes analisados, 17 foram identificados com mutações no gene *FBNI*: 11 mutações em 33 casos índice e 6 mutações em 10 casos preditivos. No total foram identificadas 12 mutações diferentes, em que 5 das quais não se encontravam descritas na literatura (Tabela 11). Todas as alterações foram encontradas em heterozigotia.

As cinco variantes novas incluem duas *frameshifts* (casos 2 e 7), uma mutação *missense* (casos 34 e 40) e duas mutações de *splicing* (casos 1, 3, 14 e 42). Uma das mutações *frameshift* é causada pela inserção de um C após a posição c.7834. Esta inserção leva à alteração do aminoácido Leucina na posição 2612 para uma Prolina, originando um codão STOP prematuro 29 resíduos a partir do primeiro aminoácido afetado (p.Leu2612Profs*29). A outra *frameshift* é causada pela deleção de um C na posição c.3962, levando à alteração de uma Treonina para uma Lisina no resíduo 1321, originando um codão STOP prematuro 92 resíduos a partir do primeiro aminoácido afetado (p.Thr1321Lysfs*92). A mutação *missense* consiste na substituição de um T para um A na posição c.4348, passando de uma Cisteína para uma Serina no codão 1450 (p.Cys1450Ser). Uma das mutações de *splicing* resulta na substituição de um A para um G na posição c.5789-2 no intrão 46, e a outra resulta de uma duplicação de um G na posição c.862+2 no intrão 8.

Tabela 11 - Resultados genéticos.

Doentes	Resultados Genéticos	Localização
	<i>FBNI</i> A. Dominante	Exão/Intrão
Caso 1	c.5789-2A>G Nova + c.6700G>A (p.Val2234Met) Reportada	Intrão 46 Exão 54
Caso 2	c.7834_7835insC (p.Leu2612Profs*29) Nova	Exão 63

Tabela 11 - Resultados genéticos (cont.).

Doentes	<i>FBN1</i> A. Dominante	Exão/Intrão
Caso 3	c.5789-2A>G Nova	Intrão 46
Caso 4	Negativo	—
Caso 5	c.5912G>A (p.Cys1971Tyr) Reportada	Exão 47
Caso 6	Negativo	—
Caso 7	c.3962delC (p.Thr1321Lysfs*92) Nova	Exão 31
Caso 8	c.4490G>C (p.Cys1497Ser) Reportada	Exão 36
Caso 9	Negativo	—
Caso 10	c.1426T>C (p.Cys476Arg) Reportada	Exão 11
Caso 11	Negativo	—
Caso 12	Negativo	—
Caso 13	Negativo	—
Caso 14	c.862+2dupG Nova	Intrão 8
Caso 15	Negativo	—
Caso 16	Negativo	—
Caso 17	Negativo	—
Caso 18	c.5912G>A (p.Cys1971Tyr) Reportada	Exão 47
Caso 19	Negativo	—
Caso 20	Negativo	—

Tabela 11 - Resultados genéticos (cont.).

Doentes	<i>FBNI</i> A. Dominante	Exão/Intrão
Caso 21	c.1285C>T p.Arg429* Reportada	Exão 10
Caso 22	Negativo	—
Caso 23	Negativo	—
Caso 24	Negativo	—
Caso 25	Negativo	—
Caso 26	Negativo	—
Caso 27	Negativo	—
Caso 28	Negativo	—
Caso 29	Negativo	—
Caso 30	c.1766A>G (p.Asn589Ser) Reportada	Exão 14
Caso 31	c.4061G>A (p.Trp1354*) Reportada	Exão 32
Caso 32	Negativo	—
Caso 33	Negativo	—
Caso 34	c.4348T>A (p.Cys1450Ser) Nova	Exão 35
Caso 35	c.4061G>A (p.Trp1354*) Reportada	Exão 32
Caso 36	c.4061G>A (p.Trp1354*) Reportada	Exão 32
Caso 37	Negativo	—
Caso 38	Negativo	—
Caso 39	Negativo	—
Caso 40	c.4348T>A (p.Cys1450Ser) Nova	Exão 35

Tabela 11 - Resultados genéticos (cont.).

Doentes	<i>FBNI</i> A. Dominante	Exão/Intrão
Caso 41	Negativo	—
Caso 42	c.5789-2A>G Nova	Intrão 46
Caso 43	Negativo	—

3.2 Patogenicidade das novas variantes

Para determinar a patogenicidade das variantes novas identificadas, foram realizadas predições *in silico* com 7 programas diferentes. Todas as predições *in silico* realizadas encontram-se resumidas na tabela 12. Como controlo, foram feitas em paralelo análises *in silico* das mutações já reportadas, encontradas nos doentes. Como já foi referido no ponto 2.9, consoante o tipo de mutação foram usados determinados programas. As mutações *missense* foram analisadas por 6 programas diferentes: *SiftBlink*[®], *UMD-Predictor*[®], *SNPeffect*[®], *SNPs&GO*[®], *PolyPhen-2*[®] e *MutationTaster*[®]. As mutações de *splicing* foram testadas pelo *MutationTaster*[®] e *Human Splicing Finder*[®] e as mutações *nonsense* apenas pelo *MutationTaster*[®].

De forma geral, os programas *in silico* tornaram-se numa ferramenta de confiança, visto que avaliaram o impacto patogénico das mutações já descritas como sendo patogénicas. Com base nos resultados obtidos, os programas *in silico* mostram que as alterações novas encontradas nos doentes são provavelmente patogénicas, à exceção de uma alteração que, segundo as predições, será um polimorfismo.

Tabela 12 - Predições *in silico*.

Predições in silico											
Localização	Mutação	Forma	Mutação reportada	Tipo de mutação	Sift-Blink	UMD-Predictor (0-100)	HSF	SNP effect	SNPs& GO	PolyPhen-2	Mutation Taster
Intrão 8	c.862+2dupG	Het	Nova	Splicing	-	-	Ocorre alt. <i>splicing</i>	-	-	-	Patogénica
Exão 10	c.1285C>T (p.Arg429*)	Het	Reportada	Nonsense	-	-	-	-	-	-	Patogénica
Exão 11	c.1426T>C (p.Cys476Arg)	Het	Reportada	Missense	Não tolerado Afeta a função da proteína score 0,00	Patogénica 100	-	Não afeta	Provavelmente patogénica	Provavelmente patogénica score 0.995	Patogénica
Exão 14	c.1766A>G (p.Asn589Ser)	Het	Reportada	Missense	Não tolerado Afeta a função da proteína score 0,00	Patogénica 84	-	Não afeta	Provavelmente patogénica	Provavelmente patogénica score 0.993	Patogénica
Exão 31	p.Thr1321Lysfs*92 (c.3962delC)	Het	Nova	Frameshift	-	-	-	-	-	-	Patogénica
Exão 32	c.4061G>A (p.Trp1354*)	Het	Reportada	Nonsense	-	-	-	-	-	-	Patogénica
Exão 35	c.4348T>A (p.Cys1450Ser)	Het	Nova	Missense	Não tolerado Afeta a função da proteína score 0,00	Patogénica 100	-	Não afeta	Provavelmente patogénica	Provavelmente patogénica score 0.611	Patogénica

Tabela 12 - Predições *in silico* (cont.).

Localização	Mutação	Forma	Mutação reportada	Tipo de mutação	Predições <i>in silico</i>						
					<i>Sift-Blink</i>	<i>UMD-Predictor</i> (0-100)	<i>HSF</i>	<i>SNP effect</i>	<i>SNPs& GO</i>	<i>PolyPhen-2</i>	<i>Mutation Taster</i>
Exão 36	c.4490G>C (p.Cys1497Ser)	Het	Reportada	Missense	Não tolerado Afeta a função da proteína score 0,00	Patogénica 100	-	Não afeta	Provavelmente patogénica	Provavelmente patogénica score 0.998	Patogénica
Intrão 46	c.5789-2A>G	Het	Nova	Splicing	-	-	Ocorre alt. <i>splicing</i>	-	-	-	Patogénica
Exão 47	c.5912G>A (p.Cys1971Tyr)	Het	Reportada	Missense	Não tolerado Afeta a função da proteína score 0,00	Patogénica 100	-	Não afeta	Provavelmente patogénica	Provavelmente patogénica score 0.989	Patogénica
Exão 54	c.6700G>A (p.Val2234Met)	Het	Reportada	Missense	Não tolerado Afeta a função da proteína score 0,00	Polimorfismo 24	-	Não afeta	Polimorfismo	Benigna score 0.311	Polimorfismo
Exão 63	c.7834_7835insC (p.Leu2612Profs*29)	Het	Nova	Frameshift	-	-	-	-	-	-	Patogénica

4 DISCUSSÃO

A mutação p.Arg429* encontra-se descrita na literatura associada a doentes com sintomas de MFS clássico, principalmente apresentando sintomas cardiovasculares.^{12,34} Esta mutação foi encontrada num doente (caso 21) que sofreu uma disseção da aorta.

A mutação p.Cys476Arg encontra-se descrita na literatura em doentes com sintomas oculares.^{12,35} O caso 10 apresenta, para além de sintomas cardiovasculares e esqueléticos, alterações no cristalino/miopia, pelo que o resultado genético obtido está concordante com a sintomatologia clínica.

O caso 30 estava referenciado como tendo critérios clínicos de síndrome de Marfan, nomeadamente sintomas oculares, e neste doente foi identificada a mutação p.Asn589Ser, que na literatura^{12,36} se encontra descrita como associada a *ectopia lentis*.

A base de dados *ClinVar* associa a mutação *nonsense* p.Trp1354* a doentes com disseção da aorta e aneurisma da aorta.^{12,37} A família identificada com esta mutação (casos 31, 35 e 36) apresentava um fenótipo positivo para Marfan e um deles tinha sido submetido a uma operação por causa de uma disseção da aorta.

A mutação p.Cys1497Ser encontrada no caso 8 está associada a sintomas clássicos de MFS, tal como a base de dados *UMD* refere.¹²

A mutação p.Cys1971Tyr, encontrada numa família (casos 5 e 18), afeta um dos seis resíduos de Cisteína dentro de uma das regiões de ligação do cálcio a um fator de crescimento epidérmico das proteínas. De facto, ao longo do tempo estes doentes têm vindo a mostrar sinais precoces de dilatação da aorta.^{12,38}

A alteração p.Val2234Met (caso 1) ainda não se encontra bem definida quanto à sua patogenicidade. Alguns estudos^{12,37} e bases de dados como a *ClinVar* e a *UMD-FBN1 Locus Specific Database* concluem que a variante tem significado desconhecido, não podendo afirmar se é um polimorfismo ou uma mutação patogénica. O mesmo foi verificado pelas análises *in silico* efetuadas, que sugerem que não tenha efeito patogénico, podendo tratar-se de um polimorfismo raro.

5 CONCLUSÕES

O objetivo deste projeto foi analisar um grupo de doentes com Marfan, que foram clinicamente diagnosticados em Hospitais portugueses, a fim de identificar mutações já descritas e por descrever e ainda fazer uma correlação genótipo-fenótipo.

As mutações encontradas através da análise genética por sequenciação do gene *FBNI* foram avaliadas de acordo com a sua patogenicidade através de 7 programas de análise *in silico*. Estes métodos de diagnóstico permitem identificar uma grande variedade de alterações novas ou de significado desconhecido. Por conseguinte, é importante dispor de ferramentas simples e de confiança para a avaliação e interpretação dessas alterações. Mutações novas, principalmente mutações *missense*, são geralmente difíceis de interpretar de acordo com a patogenicidade. Neste trabalho mostrou-se que os programas *in silico* podem ser utilizados na rotina de laboratório de forma a facilitar este trabalho.

Este é o primeiro projeto em Portugal de análise clínica e genética sistemática de doentes com Marfan. Para além disso, foi criado um registo de doentes em Portugal com as suas características clínicas e genéticas. De modo a que seja do conhecimento público, todas as mutações novas identificadas neste estudo foram submetidas na base de dados *UMD-FBNI Locus Specific Database* e aguardam confirmação de publicação.

A identificação de mutações e o reconhecimento da origem genética da doença é clinicamente útil, permitindo evitar (ou descontinuar) terapias desnecessárias e até agressivas para estes doentes, poupando-os dos efeitos secundários significativos associados à terapêutica e ainda fornecer um diagnóstico pré-natal para as famílias em situações de risco. Neste sentido, para ser capaz de obter uma boa caracterização clínica e genética do doente, em conjunto com os nossos colegas nos departamentos hospitalares de Cardiologia, pretendemos elaborar sugestões de diretrizes que possam facilitar os testes clínicos e genéticos em doentes com Marfan, em Portugal.

Os nossos resultados, juntamente com os dados clínicos, adicionaram mais informação sobre a correlação genótipo-fenótipo. A variação fenotípica da doença será usada como base para definir diretrizes para testes genéticos. Por outro lado, os nossos resultados apontam para a importância da colaboração multidisciplinar entre o médico especialista, o médico geneticista e o laboratório de diagnóstico genético.

Os nossos resultados reforçam a importância dos testes genéticos em doentes com Marfan, permitindo um diagnóstico específico e opções de terapêutica.

Este projeto poderá assegurar uma melhor compreensão dos mecanismos básicos de MFS e poderá contribuir para uma melhor abordagem terapêutica. Assim, poderemos traduzir investigação básica em aplicações clínicas com base individual.

6 BIBLIOGRAFIA

1. Van de Velde S, Fillman, R., Yandow, S, Protrusio acetabuli in Marfan syndrome. History, diagnosis, and treatment. *J. Bone Joint Surg.* **2006**. Am. 88 (3), 639–646.
2. Dietz HC. Marfan Syndrome. [Atualizado 2014 Jun 12]. In: Pagon RA, Adam MP, Ardinger HH, et al., editors. *GeneReviews®* [Internet]. Seattle (WA): University of Washington, Seattle, **2001** Apr 18; 1993-2015.
3. Robinson PN, Godfrey M., The molecular genetics of Marfan syndrome and related microfibrilopathies. *J Med Genetics*, **2000**; 37(1): 9-25.
4. Halme T, Savunen T, Aho H, Vihersaari T, Penttinen R. Elastin and collagen in the aortic wall: changes in the Marfan syndrome and annuloaortic ectasia. *Exp Mol Pathol.* **1985** Aug; 43(1):1-12.
5. Takebayashi S, Kubota I, Takagi T. Ultrastructural and histochemical studies of vascular lesions in Marfan's syndrome, with report of 4 autopsy cases. *Acta Pathol Jpn.* **1973** Nov; 23(4):847-66.
6. Weizmann Institute of Science [Internet] Israel: [Atualizado **2015**] Disponível em: <http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=FBN1&keywords=fbn1>
7. Pereira L, d'Alessio M, Ramirez F. Genomic organization of the sequence coding for fibrillin , the defective gene product in Marfan syndrome. *Hum Mol Genet* **1993**; 2: 961 – 968.
8. Sakai LY, Keene DR, Engvall E. Fibrillin, a new 350-kD glycoprotein, is a component of extracellular microfibrils. *J Cell Biol.* **1986** Dec; 103(6 Pt 1):2499-509.
9. Nussbaum R.,McInnes R., Willard H. Thompson & Thompson Genetics in Medicine. 6th ed. 2001; Philadelphia: Elsevier. Arroyo S. Ectopia Lentis Congénita, una revisión actual, [Internet]. **2013**. Disponível em: <http://www.alacsa.com/ectopia-lentis-congenita-una-revision-actual/>
10. Arroyo S. Ectopia Lentis Congénita, una revisión actual, [Internet]. **2013**. Disponível em: <http://www.alacsa.com/ectopia-lentis-congenita-una-revision-actual/>

11. Bunton TE, Biery NJ, Myers L, Gayraud B, Ramirez F, Dietz HC. Phenotypic alteration of vascular smooth muscle cells precedes elastolysis in a mouse model of Marfan syndrome. *Circ Res*. **2001** Jan 19; 88(1):37-43.
12. Collod-Beroud G, Le Bourdelles S, Ades L et. Update of the UMD-FBN1 mutation database and creation of an FBN1 polymorphism database. *Hum Mutat*, **2003**, 22, 199-208.
13. Rimoin DL, Connor JM, Pyeritz RE. Emery and Rimoin's Principles and Practice of Medical Genetics. 3th ed. **1997**. New York: Churchill Livingstone.
14. The Marfan Foundation. [Internet] Nova York: [Atualizado **2015**] Disponível em: <http://www.marfan.org/dx/rules>
15. The Marfan Foundation. [Internet] Nova York: [Atualizado **2015**] Disponível em: <http://www.marfan.org/dx>
16. McBride ART, Gargan M. Marfan syndrome. *Current Orthopedics* **2006**; 20:418-23.
17. Dean JCS. Management of Marfan syndrome. *Heart* **2002** ;88 :97-103
18. Le Parc JM. Marfan syndrome. Orphanet encyclopedia [Internet] [Atualizado **2003**] Disponível em:http://www.orpha.net/consor/cgibin/OC_Exp.php?Lng=PT&Expert=558
19. Rimoin DL, Connor JM, Pyeritz RE. Emery and Rimoin's Principles and Practice of Medical Genetics. 3th. vol.1. **1997**.New York: Churchill Livingstone.
20. Zampogna G. Medical Life Coaching [Internet] Milão: [Atualizado **2013**] Disponível em:<http://medicallifecoaching.gazzetta.it/2013/10/14/diagnosticare-la-sindrome-di-marfan/feed/>
21. Coelho MS, Guimarães PSF. Pectus carinatum. *J Bras Pneumol*. **2007**;33(4):463-474.
22. Krause KJ. Marfan Syndrome: literature review of mortality studies. *J Insur Med* **2000**;32:79-88.
23. Evangelista A, Flachskampf F, Erbel R, et al. Echocardiography in aortic diseases: EAE recommendations for clinical practice. *European Heart Journal - Cardiovascular Imaging* Sep **2010**, 11 (8) 645-658.
24. Matsuo T. How far is observation allowed in patients with ectopia lentis? *SpringerPlus*. **2015**;4:461.

25. Marfan Foundation. [Internet] New York: [Atualizado 2015] Disponível em: <http://www.marfan.org/dx/diagnosis>
26. NanoDrop Spectrophotometers, Assessment of Nucleic Acid Purity; Thermo Fisher Scientific, NanoDrop Products. [Internet] Wilmington, Delaware USA. Disponível em: <http://www.nanodrop.com/Library/T042-NanoDrop-Spectrophotometers-Nucleic-Acid-Purity-Ratios.pdf>
27. Ng PC, Henikoff S. Predicting the Effects of Amino Acid Substitutions on Protein Function. *Annual Rev Genomics Hum Genet.* **2006**;7:61–80.
28. Frédéric M, Lanlade M, Boileau C, Hamroun D, Claustres M, Béoud C, Collod-Bérout G, UMD-Predictor, a New Prediction Tool for Nucleotide Substitution Pathogenicity, Application to Four Genes: *FBN1*, *FBN2*, *TGFBR1*, and *TGFBR2*, *HUMAN MUTATION*, **2009** Vol. 30, No. 6, 952–959.
29. Ghadi R. Human Splicing Finder, [Internet] **2014**, Marseille [Atualizado 2014] Disponível em: <http://www.umd.be/HSF3/technicaltips.html>
30. De Baets G, Van Durme J, Reumers J et al, SNPeffect 4.0: on-line prediction of molecular and structural effects of protein-coding variants *Nucl. Acids Res.* **2012**, 40 (D1)
31. Capriotti et al.: WS-SNPs&GO: a web server for predicting the deleterious effect of human protein variants using functional annotation. *BMC Genomics* **2013** 14(Suppl 3):S6.
32. Adzhubei IA, Schmidt S, Peshkin L, Ramensky VE, Gerasimova A, Bork P, Kondrashov AS, Sunyaev SR. *Nat Methods* **2010**, 7(4):248-249.
33. Schwarz JM, Cooper DN, Schuelke M, Seelow D. MutationTaster2: mutation prediction for the deep-sequencing age. *Nat Methods.* **2014** Apr;11(4):361-2.
34. Rommel K, Karck M, Haverich A, Schmidtke J, Arslan-Kirchner M. Mutation screening of the fibrillin-1 (*FBN1*) gene in 76 unrelated patients with Marfan syndrome or Marfanoid features leads to the identification of 11 novel and three previously reported mutations. *Hum Mutat* **2002**: 20 (5):406–407.
35. Zadeh N, Bernstein J, Niemi AK, Dugan S, Kwan A, Liang D, Hyland JC, Hoyme HE, Hudgins L, Manning MA.. Ectopia lentis as the presenting and primary feature in Marfan syndrome. *Am J Med Genet* **2011**, Part A 155:2661–2668.

36. Pepe G, Lapini I, Evangekesti L, Attanasio M, Giusti B, Lucarini L, Fatori R, Pellicanò G, Scrivanti M, Porciani M, Abbate R, Gensini G. Is ectopia lentis in some cases a mild phenotypic expression of Marfan syndrome? Need for a long-term follow-up. *Molecular Vision* **2007**; 13:2242-47.
37. Landrum MJ, Lee JM, Riley GR, Jang W, Rubinstein WS, Church DM, Maglott DR. ClinVar: public archive of relationships among sequence variation and human phenotype. *Nucleic Acids Res.* **2014** Jan 1;42(1):D980-5. doi: 10.1093/nar/gkt1113. PubMed PMID: 24234437. SCV000233808
38. Gardella R, Nuytinck L, Barlati S, Acker V, Tadini G, De Paepe A, Colombi M. Characterization of mutations leading to recessive dystrophic epidermolysis bullosa and Marfan syndrome in a single patient. Blackwell Science Ltd. *Clinical and Experimental Dermatology*, **2001**; 26: 710-713.
39. U.S. National Library of Medicine, [Internet] **2015**, [Atualizado 2015] Disponível em: <http://ghr.nlm.nih.gov/handbook/illustrations>
40. Yuan Shi-Min, Jing Hua. Marfan's syndrome: an overview. *Sao Paulo Med. J.* **2010**; 128(6): 360-366.

7 ANEXOS

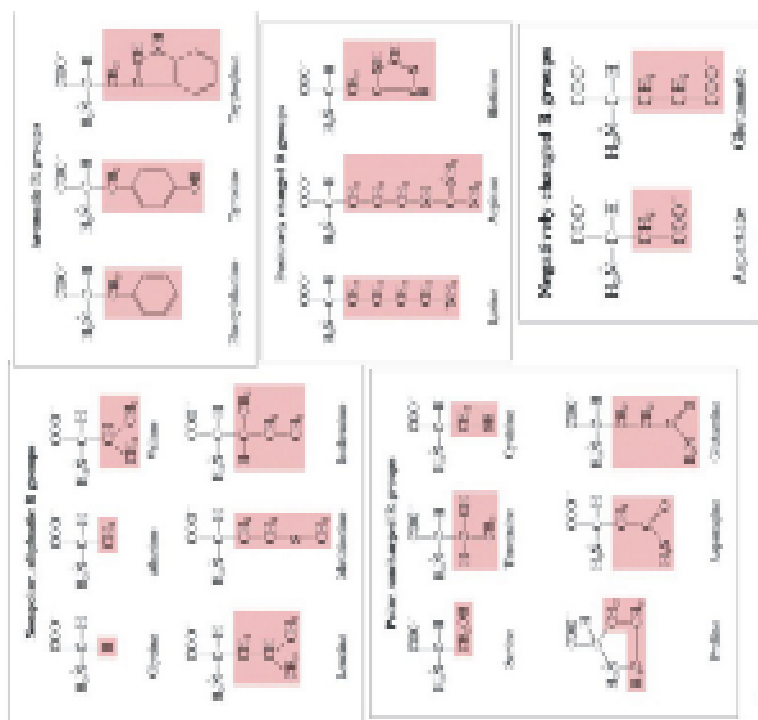
Anexo 1: *Primers* intrônicos específicos.

Exão	Nome do <i>primer</i>	Sequência do <i>primer</i> (5'→3')	Tamanho do fragmento (bp)	Condição do PCR	<i>Primers</i> de sequenciação
1	FBN1_1F	ggatttgtctctgtgttcag	465	BioTaq + DMSO	1R
	FBN1_1R	gtggaagactccttggaag		T _{ann} : 57°C	
2	FBN1_2F	ctgccaggattcatcttgct	384	BioTaq	2R
	FBN1_2R	tggtcaaaccctgtcaaagt		T _{ann} : 58°C	
3	FBN1_3F	agtacacctgaggcttaagg	311	BioTaq	3F
	FBN1_3R	ggaaaggctttccttcactcg		T _{ann} : 58°C	
4	FBN1_4F	aactcctgtgagctgttgc	289	BioTaq	4R
	FBN1_4R	gcatgtttacaagtgtccag		T _{ann} : 58°C	
5	FBN1_5F	gtgtaactgtagagtaccg	418	BioTaq	5F
	FBN1_5R	gccctgaatctatgcatgata		T _{ann} : 58°C	
6	FBN1_6F	tgcattgattctgtccctgaa	452	BioTaq	6F
	FBN1_6R	atgcagtcagcgaaattgtg		T _{ann} : 58°C	
7	FBN1_7F	ggaaacatggaagggtggaa	548	BioTaq	7R
	FBN1_7R	cacaatttcgtgactgcat		T _{ann} : 58°C	
8	FBN1_8F	gctgtttccaggacatgat	551	BioTaq	8R
	FBN1_8R	gaacagaggcacctgtgg		T _{ann} : 58°C	
9	FBN1_9F	gggggcagaggtgtgagttaat	481	BioTaq	9F
	FBN1_9R	gcagatgtaatggaaacttggg		T _{ann} : 58°C	
10-11	FBN1_10F	ttgtccagagtgggtgctg	1340	BioTaq	10F/11R
	FBN1_11R	gtaggtagtagtccaacag		T _{ann} : 60°C	
12	FBN1_12F	cactttaactgctcaaccag	410	BioTaq	12F
	FBN1_12R	ataacccatgccggaagag		T _{ann} : 60°C	
13	FBN1_13F	agccaagatcatgagtttgc	440	BioTaq	13R
	FBN1_13R	gctaggagagcttgccatt		T _{ann} : 58°C	
14	FBN1_14F	atgcacatgcaaaactcaa	459	BioTaq	14F
	FBN1_14R	ccttgaattttggttgga		T _{ann} : 58°C	
15	FBN1_15F	gcttttgttgctgatgctgc	385	BioTaq	15F
	FBN1_15R	gcagagcaacaacacacag		T _{ann} : 54°C	
16	FBN1_16F	agttacaccaggatgatgg	422	BioTaq	16R
	FBN1_16R	ccagtgtctagtcacaggta		T _{ann} : 58°C	

17	FBN1_17F	atacctcctttccggttacc	320	BioTaq	17F
	FBN1_17R	tacctgtgactagacactgg		T _{ann} : 58°C	
18	FBN1_18F	ctctgtagctcctaaggctc	346	BioTaq	18F
	FBN1_18R	ggactgggcaaatggacact		T _{ann} : 60°C	
19-20	FBN1_19F	ttgcttgaattgatcacgtcg	1029	BioTaq	19F/20R
	FBN1_20R	tctataattccaaggtgtatg		T _{ann} : 56°C	
21-22	FBN1_21F	tctataattccaaggtgtatg	1194	BioTaq + DMSO + MgCl ₂	21F/22R
	FBN1_22R	cacagggagaaatatgcagc		T _{ann} : 58°C	
23	FBN1_23F	acttaccaggttcaaaatggg	388	BioTaq	23R
	FBN1_23R	gccactcctttgacagtctt		T _{ann} : 60°C	
24	FBN1_24F	ggcaaggatacttaccacaga	446	BioTaq	24R
	FBN1_24R	atcatccagcatggacttt		T _{ann} : 61°C	
25-26	FBN1_25F	tggatcatcacacattcttgg	691	BioTaq + DMSO	25F
	FBN1_26R	ggtagaaagaatgagggaat		T _{ann} : 57°C	
27-28	FBN1_27F	gtcccaccttgagacaagg	699	BioTaq + DMSO	27F
	FBN1_28R	ggatctcatctccattatctg		T _{ann} : 58°C	
29	FBN1_29F	gatcccacatgagggtaga	507	BioTaq	29F
	FBN1_29R	agagcttaccatagtacctgg		T _{ann} : 60°C	
30	FBN1_30F	cccaatgggctagtattatgc	444	BioTaq	30F
	FBN1_30R	accagcattccaaagagagc		T _{ann} : 58°C	
31	FBN1_31F	ccagatgaaagccagctctg	524	AmpliTaq Gold + MgCl ₂ 2,5mM	31F
	FBN1_31R	ttggatccaagttgcaggtt		T _{ann} : 55°C	
32-33	FBN1_32F	tgggaagttgaaggcaagt	632	BioTaq	32F
	FBN1_33R	tcatttggcactagagctct		T _{ann} : 60°C	
34	FBN1_34F	ccaaaacattgctgcactgg	290	BioTaq	34F
	FBN1_34R	ggttatttaaacattctgatg		T _{ann} : 58°C	
35	FBN1_35F	gaagtgccagattggtgtt	413	BioTaq	35R
	FBN1_35R	ttctcagacctggaactgatt		T _{ann} : 58°C	
36-37	FBN1_36F	tctctgaagtggaagactgc	931	BioTaq	36F/37R
	FBN1_37R	cctggttggctcacactaaa		T _{ann} : 58°C	
38-39	FBN1_38F	atgggaagtgtacacaaagg	635	BioTaq	38F
	FBN1_39R	ggactaatgttactcaagtga		T _{ann} : 61°C	
40-41	FBN1_40F	gacacggatgaatgaaatacc	1323	BioTaq	40F/41R
	FBN1_41R	ccagacttgtagactcagca		T _{ann} : 60°C	
42	FBN1_42F	aggcaagattatatctgtagg	424	BioTaq	42F
	FBN1_42R	gcagctccacctaattggc		T _{ann} : 60°C	

43	FBN1_43F	gtccctattgccatcaccac	411	BioTaq	43R
	FBN1_43R	agtaaagggcatggtgtgga		T _{ann} : 60°C	
44	FBN1_44F	gttgcttccaaattctggc	500	BioTaq	44F
	FBN1_44R	cctctttctggatgagatat		T _{ann} : 58°C	
45	FBN1_45F	gcctggtaaagagagtaag	478	BioTaq	45F
	FBN1_45R	gcaatctgaacatgataaacc		T _{ann} : 58°C	
46	FBN1_46F	cctggtatcttcagggatg	495	BioTaq	46F
	FBN1_46R	gtgagggatacattctgagac		T _{ann} : 58°C	
47-48	FBN1_47F	ttggcatttctgtttggcta	1264	BioTaq + DMSO	47F/48R
	FBN1_48R	atcctcttggaagacaaga		T _{ann} : 60°C	
49	FBN1_49F	tccagtccacagtgttatgg	402	BioTaq	49F
	FBN1_49R	ggagagtttcatcaccaca		T _{ann} : 58°C	
50	FBN1_50F	aaggagtattgctgtgtgcc	363	BioTaq	50F
	FBN1_50R	ctgtaggccttaagacagta		T _{ann} : 58°C	
51-52	FBN1_51F	caacatcttagggagtctcg	804	BioTaq	51F
	FBN1_52R	gctgcagcactgaaccaca		T _{ann} : 61°C	
53	FBN1_53F	agcactgcagtctggatgtc	399	BioTaq	53F
	FBN1_53R	gctgcagcactgaaccaca		T _{ann} : 60°C	
54	FBN1_54F	ggaaatgggagaccacttga	371	BioTaq	54F
	FBN1_54R	agaaggctgggaattggaat		T _{ann} : 60°C	
55	FBN1_55F	atactcaacagagcagaagg	504	BioTaq	55F
	FBN1_55R	ggcctttgtctgctttcttg		T _{ann} : 60°C	
56	FBN1_56F	gaacaaagggaggggaaggag	389	BioTaq	56F
	FBN1_56R	tggagatgccgtaatgactg		T _{ann} : 58°C	
57	FBN1_57F	gcttccctcttctgcttctt	441	BioTaq	57F
	FBN1_57R	tggagtttgcaatatgtgcc		T _{ann} : 58°C	
58-59	FBN1_58F	tttatgctgtcatcttactgg	782	AmpliTaq Gold + MgCl ₂ 2,5mM	58F/59R
	FBN1_59R	ggttaatgcctccatggga		T _{ann} : 60°C	
60-61	FBN1_60F	gtggcttctttctagtcagg	792	BioTaq	60F
	FBN1_61R	gcacaggtcctgtatcttag		T _{ann} : 60°C	
62	FBN1_62F	ggtggtagaataatgtgtagg	447	BioTaq	62F
	FBN1_62R	ggtgctttgagagcatctga		T _{ann} : 58°C	
63	FBN1_63F	agccacctctgcctgtctta	473	BioTaq	63F
	FBN1_63R	gcagaggagaaccatgcttt		T _{ann} : 60°C	
64	FBN1_64F	gatcctccagtggacaagc	512	BioTaq	64R
	FBN1_64R	gggagtgggcatttgaaggtt		T _{ann} : 60°C	
65	FBN1_65F	attgtgtatgcagcataagg	782	BioTaq	65F
	FBN1_65R	ggacgtgtattccattgg		T _{ann} : 55°C	

Anexo 2: Código genético e propriedades dos aminoácidos.

[illegible]